

肺サーファクタントタンパク質 A による ヒト β -デフェンシン 3 の機能調節

有木 茂¹、齋藤充史²

¹ 札幌医科大学・医療人育成センター教養教育研究部門・化学

² 札幌医科大学・医学部・医化学講座

抗菌ペプチドは多機能性を示す自然免疫タンパク質である。抗菌ペプチドの機能をうまく制御する方法を開発できれば、既存の抗生剤が効かない感染症に対する治療法や、慢性炎症の病態改善に有効な治療法の開発につながる事が期待される。著者らは呼吸器の生体防御に関与するタンパク質の一つが、抗菌ペプチドの機能制御因子としてはたらく可能性を示す研究結果を得たので紹介する。

キーワード：自然免疫, 炎症, 抗菌ペプチド, サーファクタントタンパク質 A

1. はじめに

全ての多細胞生物は、感染微生物から自己を守るための生体防御システムを備えている。生体防御システムは、自然免疫と獲得免疫に大別できる。獲得免疫は、遺伝子再構成により得られる莫大な数のタンパク質（抗体など）を利用することで、多種多様な感染微生物（細菌・ウイルス・真菌など）を特異的に認識して攻撃する。しかしながら、遺伝子再構成や抗体産生細胞の成熟などに時間を要するため、獲得免疫が機能するまでには感染微生物侵入後に一定の時間が必要である。一方、自然免疫に関わる多くのタンパク質は、感染微生物の侵入前から体内に準備されており、感染微生物表面に共通して存在する分子パターンを認識する。すなわち、自然免疫は個々の感染微生物に対する特異性は低いものの、あらゆる感染微生物に即時対応できるように進化したシステムであると考えられる。自然免疫系のタンパク質が認識する分子パターンは、感染微生物の生存にとって必須である場合が多く、その構造を大きく変化させるのは容易でない。このことから、自然免疫系のタンパク質をうまく応用すれば、耐性菌の出現する可能性が低い、画期的な感染症治療法の開発につながる事が期待される。

自然免疫に関与するタンパク質のなかに、抗菌ペプチドとよばれる分子群がある。抗菌ペプチドは、感染微生物を殺菌するほか、免疫細胞を感染部位に呼び寄

せて活性化させる。また、創傷治癒を促進するなど多機能性を示すタンパク質である⁽¹⁾。抗菌ペプチドは抗菌スペクトルが広く、殺菌力も強いいため新規の感染症治療薬としての臨床応用が期待されている。特に、既存の抗生剤とは殺菌メカニズムが異なるため、多剤耐性菌に対する効果が期待されている。しかし、抗菌ペプチドが高濃度に存在すると、宿主自身の細胞もダメージを受けることから、臨床応用の大きな障害となっている。

著者らは、呼吸器の自然免疫に関与する肺サーファクタントタンパク質 A（以下 SP-A と略）の機能解析を行ってきた⁽²⁾。その過程で、SP-A が抗菌ペプチドのひとつであるヒト β -ディフェンシン 3（以下 hBD3 と略）と相互作用することを見出していたが、この相互作用の生理的意義については不明であった。最近の研究で、SP-A が hBD3 の機能調節因子となりうることを明らかにしたので、その成果を概説し、今後の研究の展望について検討する。

2. hBD3 の抗菌活性と宿主細胞傷害性に対する SP-A の影響

高濃度の抗菌ペプチドは宿主細胞に対しても傷害を与えてしまう。hBD3 も例外ではなく、10-50 μ g/ml の濃度で上皮細胞やマクロファージに対して傷害活性を示した。SP-A は hBD3 と相互作用することから、宿主細胞傷害活性を中和するのではないかと考えられた。

そこで、SP-A 存在下で上皮細胞やマクロファージを hBD3 処理したところ、予想通り hBD3 の宿主細胞傷害活性は抑制された。これらの結果をより明確にするため、SP-A 欠損マウスに経気道的に hBD3 を投与し、肺組織における傷害の程度を野生型マウスと比較した。その結果、SP-A 欠損マウスの肺では、肺胞壁の肥厚や乳酸脱水素酵素 (LDH: 組織傷害のマーカーとして用いられるタンパク質) の漏出が、野生型マウスの肺と比較して顕著にみられた。このことは、SP-A が hBD3 の宿主細胞傷害活性を生体内においても抑制していることを示している⁽³⁾。

我々は SP-A が hBD3 と相互作用してトラップすることで、hBD3 の全ての機能を抑制するのではないかと考えていた。しかしながら、驚くことに SP-A は hBD3 の抗菌活性は抑制しなかった⁽³⁾。これらの結果から、SP-A は単に hBD3 をトラップするのではなく、機能調節因子としてはたらくのではないかと考え、hBD3 の他の機能に対する SP-A の影響を解析した。

3. hBD3 による肥満細胞の活性化に対する SP-A の影響

hBD3 は肥満細胞を活性化し、遊走、脱顆粒、脂質メディエーター産生などを引き起こすことが知られている。肥満細胞は、花粉症などのアレルギー疾患への関与が有名であるが、その他にも多くの慢性炎症疾患の病態形成に関与する免疫細胞である⁽⁴⁾。感染をきっかけとする気管支喘息の増悪など、感染により発現誘導された抗菌ペプチドによる肥満細胞の活性化と病態との関連が注目されている。hBD3 による肥満細胞の活性化への SP-A の影響を解析したところ、SP-A は hBD3 による

肥満細胞の遊走を抑制した。一方、hBD3 刺激による脱顆粒、脂質メディエーターの産生に対しては SP-A の影響はみられなかった⁽⁵⁾。これらの結果からも、SP-A は hBD3 の特定の機能のみを抑制する機能制御因子としてはたらくしている可能性が示唆される。

4. SP-A の機能部位の同定

上述したような SP-A の機能には、SP-A の全体が必要なのか、あるいは SP-A の一部分だけでも機能するのかを解析した。SP-A をタンパク質加水分解酵素 (リジルエンドペプチダーゼ) で断片化し、回収した断片ごとに活性を評価した。その結果、161 番目のチロシンから 201 番目のリジンを含むペプチド断片 (以下 SP-A-derived Peptide の頭文字をとって SAP01 と略) でも SP-A と同等の活性を示すことが明らかとなった (図 1)⁽³⁾。すなわち、SAP01 は hBD3 の宿主細胞傷害活性や肥満細胞誘引活性を抑制したが、抗菌活性、肥満細胞の脱顆粒・脂質メディエーター産生を誘導する活性は阻害しなかった。SAP01 に相当する領域は SP-A の立体構造上では表面に飛び出したループ状の構造を形成しており、この部分が hBD3 との相互作用に関与している可能性が非常に高いと考えられる⁽⁶⁾。

hBD3 をはじめとする抗菌ペプチドは、塩基性に富んだ領域、疎水性に富んだ領域の両方を含んでおり、両親媒性の立体構造を形成する⁽⁷⁾。一方、SAP01 は芳香族アミノ酸を多く含んでおり、これらのアミノ酸が hBD3 の疎水性の領域と疎水結合するのではないかと考えているが、結晶構造解析や核磁気共鳴 (NMR) を用いた解析により確認する必要がある。

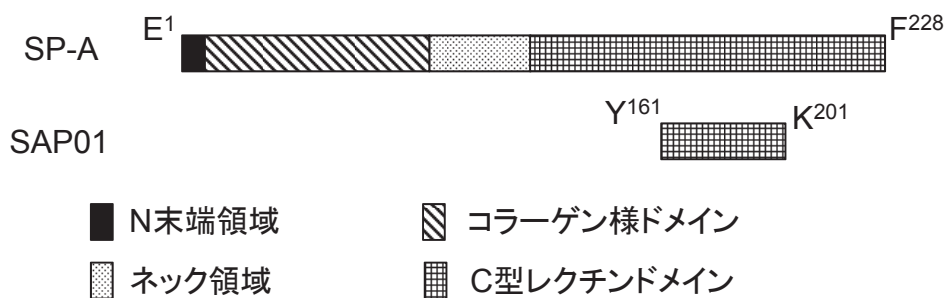


図1 SP-A のドメイン構造と SAP01 の位置

SP-A は 228 アミノ酸残基からなる単量体が 3 つ集まり 3 量体を形成し、この 3 量体がさらに 6 つ集まり 18 量体を形成して、花束様の特徴的な高次構造を示す。単量体の構造中には、2 つのドメインと 2 つの領域が含まれている。このうち、N 末端領域とコラーゲン様ドメインは、多量体の形成と安定化に必要である。C 型レクチンドメインは糖鎖認識に関与するドメインであり、SP-A の様々な生理作用にとって重要なドメインである。

SAP01 は C 型レクチンドメインの一部であり、芳香族アミノ酸に富んだ領域である。

5. 今後の研究の展望

抗菌ペプチドの臨床応用を目指した研究は、抗菌ペプチドのアミノ酸配列に改変を加えて宿主細胞傷害性を低減するという手法が主流であった。あるいは、他の生物種由来の宿主細胞傷害性が低い抗菌ペプチドを利用しようという試みもみられる。しかし、抗菌ペプチドの抗菌活性と宿主細胞傷害活性の間には相関関係があるようで、宿主細胞傷害性の低い抗菌ペプチドは抗菌活性も弱い傾向がある。我々は、SP-A が hBD3 の抗菌活性には影響を与えずに宿主細胞傷害活性のみを抑制することを報告した。このことは、SP-A と hBD3 を組み合わせて使うことで、副作用の少ない新規感染症治療薬として臨床応用できる可能性を示している。今後、実験動物を用いた感染症モデルを作製し、SP-A と hBD3 を混合投与して治療効果が得られるのかを検討していきたい。近年、多剤耐性菌感染が増加しており、社会的な問題となっている。hBD3 は薬剤耐性菌にも抗菌活性を発揮するので、臨床応用できれば、多剤耐性菌に対する治療法として有効であることが期待される。

hBD3 は抗菌活性以外にも多様な機能を示す (図 2)。これまで、いくつかの機能に対する SP-A の影響を解析してきたが、他の機能に関しても解析を進めていきたい。これらの解析と、hBD3 および SP-A の共結晶構造解析を行うことで、hBD3 が多様な機能を発揮するのに必要なアミノ酸残基や立体構造を明らかにできる可能性がある。うまくいけば、hBD3 のような小さなペプチドが、いかにして多様な機能を発揮するのかという疑問の解決に道筋をつけられるかもしれない。

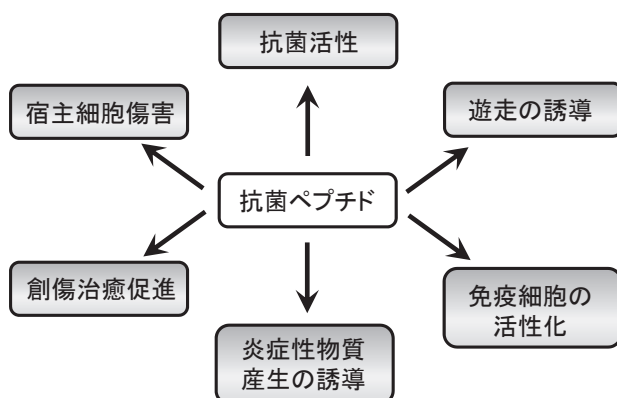


図 2 抗菌ペプチドが示す様々な機能

抗菌ペプチドは、抗菌活性を示すペプチドの総称であるが、抗菌活性のみならず様々な生理作用を示す。また、作用を示す対象も多岐にわたり、肥満細胞、好中球、マクロファージ、上皮細胞など様々な細胞種の遊走・活性化に関与する。

参考文献

- (1) Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* 30: 131-141. 2009
- (2) Arikawa S, Nishitani C, Kuroki Y. Diverse functions of pulmonary collectins in host defense of the lung. *J Biomed Biotechnol.* 2012: article ID 532071. 2012
- (3) Saito A, Arikawa S, Sohma H, Nishitani C, Inoue K, Ebata N, Takahashi M, Hasegawa Y, Kuronuma K, Takahashi H, Kuroki Y. Pulmonary surfactant protein A protects lung epithelium from cytotoxicity of human β -defensin 3. *J Biol Chem.* 287: 15034-15043. 2012
- (4) Theoharides TC, Alysandratos KD, Angelidou A, Delivanis DA, Sismanopoulos N, Zhang B, Asadi S, Vasiadi M, Weng Z, Miniati A, Kalogeromitros D. Mast cells and inflammation. *Biochim Biophys Acta.* 1822: 21-33. 2012
- (5) 有木茂, 上原康昭, 村田雅樹, 高宮里奈, 長谷川喜弘, 齋藤充史, 千葉弘文, 黒沼幸治, 高橋素子, 高橋弘毅, 黒木由夫. SP-A および SP-A 由来ペプチドはヒト β -ディフェンシン 3 による肥満細胞の遊走を抑制する. *分子呼吸器病* 20: 120-123. 2016
- (6) Head JF, Mealy TR, McCormack FX, Seaton BA. Crystal structure of trimeric carbohydrate recognition and neck domains of surfactant protein A. *J Biol Chem.* 278: 43254-43260. 2003
- (7) Schibli DJ, Hunter HN, Aseyev V, Starner TD, Wiencek JM, McCray PB, Tack BF, Vogel HJ. The solution structures of the human β -defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem.* 277: 8279-8289. 2002

